

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

RECEIVED
MAY 2 1997
GPO

Date of mailing (day/month/year)

15 May 1997 (15.05.97)

International application No.

PCT/EP95/03757

International filing date (day/month/year)

22 September 1995 (22.09.95)

Applicant

FORSSMANN, Wolf-Georg et al

1460

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

L. Panakal

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Washington D.C. 20231
United States of America

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

03 May 1996 (03.05.96)

International application No.

PCT/EP95/03757

Applicant's or agent's file reference

958001 pct

International filing date (day/month/year)

22 September 1995 (22.09.95)

Priority date (day/month/year)

28 September 1994 (28.09.94)

Applicant

FORSSMANN, Wolf-Georg et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 April 1996 (23.04.96)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

G. Bähr

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 958001 pct	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> WEITERES VORGEHEN </div> <div style="width: 50%;"> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 </div> </div>	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/03757	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/95	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/94
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,

☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. -

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17.Februar 1994 siehe Ansprüche; Beispiel 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24.Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' siehe Zusammenfassung & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/-	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Januar 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26. 01. 96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1. Februar 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' siehe Zusammenfassung & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981 ---	1,2,4-6
X	JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US, Seiten 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Absatz 2 siehe Seite 4, Absatz 1 siehe 'results' und 'discussion' auf den Seiten 5-12 ---	1-6
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' siehe Seite 567, rechte Spalte, Absatz 2 siehe Seite 568, rechte Spalte, Absatz 5; Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26. Oktober 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' siehe Zusammenfassung & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981 ---	1,2
2 X	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8. Februar 1985 siehe Fragment 10 auf Seite 25 und Fragment 40 auf Seite 50 --- -/--	1-3

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, siehe Seite 169, Absatz 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' siehe Abbildung 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe Seite 5, Absatz 3; Ansprüche 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11.Juli 1985 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/03757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- 2141588 EP-A- 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- 1684818 JP-B- 3052479 JP-A- 60034996 JP-A- 61024598 DE-A- 3428942 US-A- 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- 3935738 AT-T- 121424 AU-B- 643725 AU-B- 6871291 CA-A- 2071538 DE-D- 59008949 EP-A- 0497915 ES-T- 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	NONE	

TRANSLATION
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9580001 pct	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 95/03757	International filing date (day/month/year) 22.09.1995	Priority date (day/month/year) 28.09.1994
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/635		
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 11 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of the invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23.04.1996	Date of completion of this report 17.12.1996
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 95/03757

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3 - 5	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims	3 - 5	YES
	Claims	1, 2	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Novelty:

Several peptides listed in claim 1 are already described in the prior art (see, for example, WO-A-94/03201 (1), page 9, fragment 24 - 37 (1), FR-A-2 550 204 (2), fragments 10 and 40, Journal of Immunoassay, Vol. 13, No. 1, 1992, pages 1 - 13, J. Tampe et al. (3), Journal of Pharmacology and Exp. Ther. (1981), 216(3), 567 - 571, P. K. T. Pang et al. (4), see fragment 24 - 34, page 568, last paragraph, and Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 21, 24.05.82, abstract No 174594, R. Nakamura et al. (5), see fragment 1 - 7).

Although the sequences of the specified peptide fragments are not explicitly mentioned in (1) - (3) and (5), the corresponding peptides in claim 1 are nevertheless deprived of novelty, firstly because the hPTH sequence is defined in the prior art (see, for example, Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, Wingender E. et al. (6), page 170, Figure 1 and secondly because the designation of the hPTH peptide fragments used in the cited documents conforms to the universally accepted standard nomenclature, and therefore a person skilled in the art knows immediately which sequence of the corresponding peptide fragment is encompassed. In addition, the sequence of fragment 1 - 6 in (3) can be

.../...

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 95/03757

(Continuation of V.2)

derived from the sequence of fragment 24 - 30 disclosed in (3). As well as the peptide fragment 1 - 6, the fragments 9 - 14, 13 - 18 and 24 - 29 claimed in claim 1 are also deprived of novelty by (3), because they are inherently disclosed in (3) (see page 4, first paragraph and Figures).

Although the peptide fragments described in (2) have protective groups as well on the amino acids, the fragments of formulae (10) and (40) are prejudicial to novelty for the fragments 1 - 7 and 24 - 28 claimed in claim 1, because it is clear from claim 2, which is dependent on claim 1, that the peptide fragments are not restricted to the form shown in claim 1, but that the amino acids may also be present in modified form.

Consequently, the subject matter of the present claim 1 does not comply with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

The same considerations apply to claim 2, the novelty of which is anticipated by the teaching of (2).

Inventive step:

None of the available documents deals with the problem addressed by the present application, i.e., the provision of peptide fragments from hPTH which make it possible to produce antibodies that enable active hPTH peptide fragments to be distinguished from non-active hPTH peptide fragments. Consequently, the subject matter of claims 3 - 5 appears to involve an inventive step, having regard to the available prior art (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 95/03757

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The applicant is advised that, if the present international application is prosecuted as a European-PCT application, the subject matter of claims 3 and 4, which are so-called product-by-process claims, would not be considered either novel or inventive, because the antibodies defined in these claims are indistinguishable from, for example, the monoclonal antibody A1-64 disclosed in (3) or those described in Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 5, 01.02.82, abstract No. 29060, S. R. Nussbaumer et al. (6).

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9580001 pct	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 95/03757	International filing date (day/month/year) 22.09.1995	Priority date (day/month/year) 28.09.1994
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/635		
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of 11 sheets.
- This report contains indications relating to the following items:
 - ☒ Basis of the report
 - ☐ Priority
 - ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Lack of unity of the invention
 - ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Certain documents cited
 - ☒ Certain defects in the international application
 - ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23.04.1996	Date of completion of this report 17.12.1996
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	3 - 5	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims	3 - 5	YES
	Claims	1, 2	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Novelty:

Several peptides listed in claim 1 are already described in the prior art (see, for example, WO-A-94/03201 (1), page 9, fragment 24 - 37 (1), FR-A-2 550 204 (2), fragments 10 and 40, Journal of Immunoassay, Vol. 13, No. 1, 1992, pages 1 - 13, J. Tampe et al. (3), Journal of Pharmacology and Exp. Ther. (1981), 216(3), 567 - 571, P. K. T. Pang et al. (4), see fragment 24 - 34, page 568, last paragraph, and Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 21, 24.05.82, abstract No 174594, R. Nakamura et al. (5), see fragment 1 - 7):

Although the sequences of the specified peptide fragments are not explicitly mentioned in (1) - (3) and (5), the corresponding peptides in claim 1 are nevertheless deprived of novelty, firstly because the hPTH sequence is defined in the prior art (see, for example, Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, Wingender E. et al. (6), page 170, Figure 1 and secondly because the designation of the hPTH peptide fragments used in the cited documents conforms to the universally accepted standard nomenclature, and therefore a person skilled in the art knows immediately which sequence of the corresponding peptide fragment is encompassed. In addition, the sequence of fragment 1 - 6 in (3) can be

.../...

(Continuation of V.2)

derived from the sequence of fragment 24 - 30 disclosed in (3). As well as the peptide fragment 1 - 6, the fragments 9 - 14, 13 - 18 and 24 - 29 claimed in claim 1 are also deprived of novelty by (3), because they are inherently disclosed in (3) (see page 4, first paragraph and Figures).

Although the peptide fragments described in (2) have protective groups as well on the amino acids, the fragments of formulae (10) and (40) are prejudicial to novelty for the fragments 1 - 7 and 24 - 28 claimed in claim 1, because it is clear from claim 2, which is dependent on claim 1, that the peptide fragments are not restricted to the form shown in claim 1, but that the amino acids may also be present in modified form.

Consequently, the subject matter of the present claim 1 does not comply with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

The same considerations apply to claim 2, the novelty of which is anticipated by the teaching of (2).

Inventive step:

None of the available documents deals with the problem addressed by the present application, i.e., the provision of peptide fragments from hPTH which make it possible to produce antibodies that enable active hPTH peptide fragments to be distinguished from non-active hPTH peptide fragments. Consequently, the subject matter of claims 3 - 5 appears to involve an inventive step, having regard to the available prior art (PCT Article 33(3)).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The applicant is advised that, if the present international application is prosecuted as a European-PCT application, the subject matter of claims 3 and 4, which are so-called product-by-process claims, would not be considered either novel or inventive, because the antibodies defined in these claims are indistinguishable from, for example, the monoclonal antibody A1-64 disclosed in (3) or those described in Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 5, 01.02.82, abstract No. 29060, S. R. Nussbaumer et al. (6).

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A-	2141588	17-02-94
		EP-A-	0656784	14-06-95

FR-A-2550204	08-02-85	JP-C-	1684818	31-07-92
		JP-B-	3052479	12-08-91
		JP-A-	60034996	22-02-85
		JP-A-	61024598	03-02-86
		DE-A-	3428942	28-02-85
		US-A-	4656250	07-04-87

WO-A-9106564	16-05-91	DE-A-	3935738	08-05-91
		AT-T-	121424	15-05-95
		AU-B-	643725	25-11-93
		AU-B-	6871291	31-05-91
		CA-A-	2071538	28-04-91
		DE-D-	59008949	24-05-95
		EP-A-	0497915	12-08-92
		ES-T-	2071837	01-07-95

DE-A-3347548	11-07-85	KEINE		

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17 February 1994 see claims; example 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24 May 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' see abstract & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/--	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

26. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17.Februar 1994 siehe Ansprüche; Beispiel 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24.Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' siehe Zusammenfassung & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE;ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/--	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10.Januar 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26.01.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1. Februar 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' siehe Zusammenfassung & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981	1,2,4-6
X	--- JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US, Seiten 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Absatz 2 siehe Seite 4, Absatz 1 siehe 'results' und 'discussion' auf den Seiten 5-12	1-6
X	--- J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' siehe Seite 567, rechte Spalte, Absatz 2 siehe Seite 568, rechte Spalte, Absatz 5; Abbildung 1; Tabelle 1	1,2
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26. Oktober 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' siehe Zusammenfassung & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981	1,2
X	--- FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8. Februar 1985 siehe Fragment 10 auf Seite 25 und Fragment 40 auf Seite 50 --- -/--	1-3

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, siehe Seite 169, Absatz 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' siehe Abbildung 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe Seite 5, Absatz 3; Ansprüche 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11.Juli 1985 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,4-6

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1 February 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' see abstract & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,4-6
X	<p>JOURNAL OF IMMUNOASSAY, vol. 13, no. 1, 1992 NEW YORK, US, pages 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' cited in the application see page 2, paragraph 2 see page 4, paragraph 1 see results and discussion of the pages 5-12;</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-6
X	<p>J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' see page 567, right column, paragraph 2 see page 568, right column, paragraph 5; figure 1; table 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26 October 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' see abstract & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
X	<p>FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8 February 1985 see fragment 10 of page 25 and fragment 40 of page 50.</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-3

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- 2141588 EP-A- 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- 1684818 JP-B- 3052479 JP-A- 60034996 JP-A- 61024598 DE-A- 3428942 US-A- 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- 3935738 AT-T- 121424 AU-B- 643725 AU-B- 6871291 CA-A- 2071538 DE-D- 59008949 EP-A- 0497915 ES-T- 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	NONE	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, see page 169, paragraph 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 208, 1986 NEW YORK, US, pages 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' see figure 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16 May 1991 see page 5, paragraph 3; claims 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11 July 1985 see claims; examples -----	1,4-6

Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz
5 des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktivem h-PTH.

10

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren
15 biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht
20 ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für das N-terminale Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von
25 10^{-12} mol/l gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmunometric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno
30 Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

35 Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

- körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.
- 20 Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.
- 25 Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:
- 35

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH (1)

hPTH 1-9

5 NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH (2)

hPTH 1-8

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH (3)

10 hPTH 1-7

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH (4)

hPTH 1-6

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH (5)

15

hPTH 1-5

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH (6)

hPTH 9-18

20 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (7)

hPTH 10-18

NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)

25 hPTH 11-18

NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)

hPTH 12-18

NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)

30

hPTH 13-18

NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)

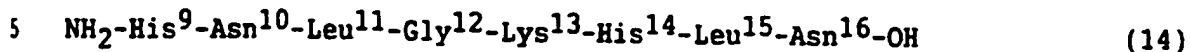
hPTH 14-18

35 NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17



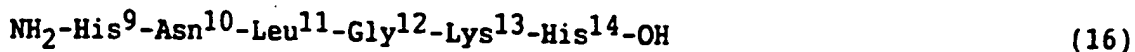
hPTH 9-16



hPTH 9-15



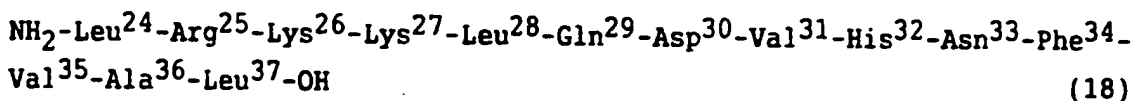
10 hPTH 9-14



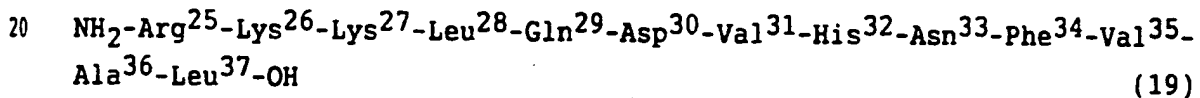
hPTH 9-13



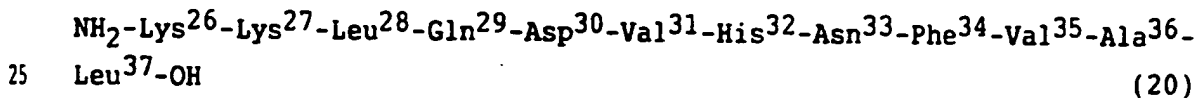
15 hPTH 24-37



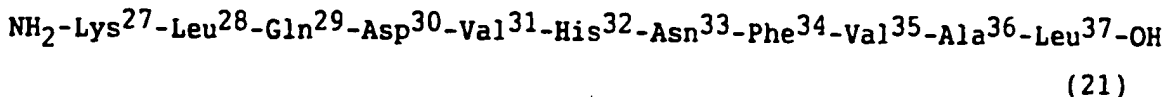
hPTH 25-37



hPTH 26-37



hPTH 27-37

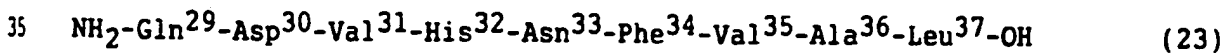


30

hPTH 28-37



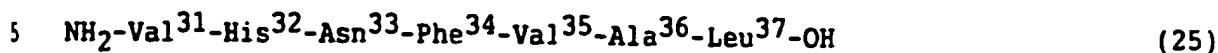
hPTH 29-37



hPTH 30-37



hPTH 31-37



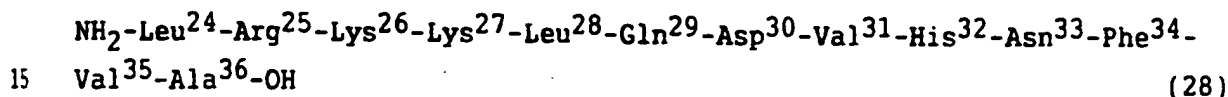
hPTH 32-37



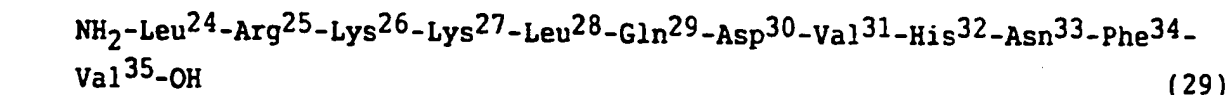
10 hPTH 33-37



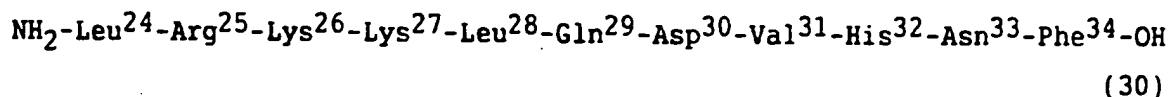
hPTH 24-36



hPTH 24-35



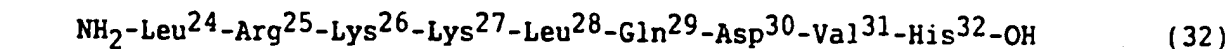
hPTH 24-34



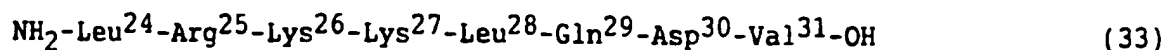
25 hPTH 24-33



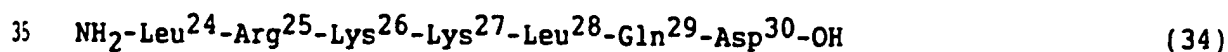
hPTH 24-32



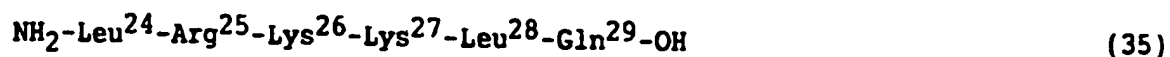
hPTH 24-31



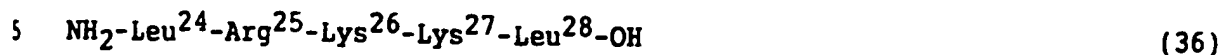
hPTH 24-30



hPTH 24-29



hPTH 24-28



Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung
10 dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten
15 Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerläßlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und
20 Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können
25 also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem so weit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern
30 würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-,
35 Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch
5 Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fractionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide auf-
10 weisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_c auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.
15
20

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.
25

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-
35

Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazbicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylet-

her ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wässriger Lösung lyophilisiert.

5

Beispiel 2

Reinigung und Analyse

10 Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

15

Die Reinheit der Produkte wird durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

20

Beispiel 3

Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder-
25 serumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid-Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid-Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung
30 erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer
35 Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

5

Beispiel 4

Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

- 10 Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin , gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen
- 15 Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

Beispiel 5

26 Immunisierung

- Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten
- 25 Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

- Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkom-
- 30 plettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

5 1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.

10 2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz

hPTH 1-10

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-OH}$ (1)

15 hPTH 1-9

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-OH}$ (2)

hPTH 1-8

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-OH}$ (3)

20

hPTH 1-7

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$ (4)

hPTH 1-6

25 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$ (5)

hPTH 1-5

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$ (6)

30 hPTH 9-18

$\text{NH}_2\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-Leu}^{11}\text{-Gly}^{12}\text{-Lys}^{13}\text{-His}^{14}\text{-Leu}^{15}\text{-Asn}^{16}\text{-Ser}^{17}\text{-Met}^{18}\text{-OH}$ (7)

35

hPTH 10-18

NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)

hPTH 11-18

5 NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)

hPTH 12-18

NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)

10 hPTH 13-18

NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)

hPTH 14-18

15 NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

20 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

25 hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

30 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

5

hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

10

NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (21)

hPTH 28-37

15

NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-
OH (22)

hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

20

hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

25

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

30

NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

35

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

5

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-OH (30)

10

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
OH (31)

hPTH 24-32

15

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

20

hPTH 24-30

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH (35)

25

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH (36)

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen
Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende
modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-
, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten,
und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin,
Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Maus-
serumalbumin.

35

4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß
5 mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immunisierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß
10 mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich
15 durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37).

08/ 817547

16x1

16464

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 19 DEC 1996

WIPO

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 958001 pct	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 03757	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1994
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/635		
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt 11 Blätter.


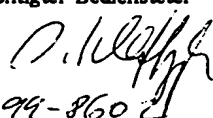
3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

RECEIVED

JUL 24 1998

GROUP 1600

Datum der Einreichung des Antrags 23/04/1996	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 17 DEC 1996
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  I. Scheffzyk Tel. 2399-8602

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit

Ansprüche 3-5 _____ JA
Ansprüche 1, 2 _____ NEIN

Erfinderische Tätigkeit

Ansprüche 3-5 _____ JA
Ansprüche 1, 2 _____ NEIN

Gewerbliche Anwendbarkeit

Ansprüche 1-5 _____ JA
Ansprüche _____ NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

Neuheit:

Einige der im Anspruch 1 aufgelisteten Peptide sind bereits im Stand der Technik beschrieben (siehe z.B. WO-A-94 03201 (1), Seite 9, Fragment 24-37 (1), FR-A-2 550 204 (2), Fragmente 10 und 40, Journal of Immunoassay, Bd. 13, Nr. 1, 1992, Seiten 1-13, J.Tampe et al. (3), Journal of Pharmacology and Exp. Ther. (1981), 216(3), 567-71, P.K.T. Pang et al (4), siehe Fragment 24-34, Seite 568, letzter Absatz sowie Chemical Abstracts, vol. 96, no. 21, 24.05.82, Abstract Nr.174594, R. Nakamura et al (5), siehe Fragment 1-7). Ungeachtet der Tatsache, dass die Sequenzen der aufgeführten Peptidfragmente in (1)-(3) und (5) nicht ausdrücklich erwähnt sind, sind die entsprechenden Peptide in Anspruch 1 dennoch neuheitschädlich getroffen, denn erstens ist die Sequenz von hPTH im Stand der Technik festgelegt (siehe z.B. Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, Wingender E. et al. (6), Seite 170, Figur 1 und zweitens

entspricht die, in den aufgeführten Dokumenten verwendete Bezeichnung der hPTH Peptidfragmente der allgemein anerkannten Standardnomenklatur, so dass der Fachmann sofort weiß welche Sequenz von dem jeweiligen Peptidfragment umfaßt wird. Zudem ist in (3) die Sequenz des Fragments 1-6 aus der in (3) offenbarten Sequenz des Fragments 24-30 ableitbar. Neben dem Peptidfragment 1-6 sind auch die in Anspruch 1 beanspruchten Fragmente 9-14, 13-18 sowie 24-29 von (3) neuheitsschädlich getroffen, denn diese sind in (3) inherent offenbart (siehe Seite 4, erster Absatz und die Figuren).

Obwohl die in (2) beschriebenen Peptidfragmente noch Schutzgruppen an den Aminosäuren aufweisen sind die Fragmente gemäss Formeln (10) und (40) für die in Anspruch 1 beanspruchten Fragmente 1-7 und 24-28 neuheitsschädlich, denn aus Anspruch 2, welcher von Anspruch 1 abhängig ist, geht hervor, dass die Peptidfragmente nicht auf die in Anspruch 1 gezeigte Form beschränkt sind, sondern dass die Aminosäuren auch in modifizierter Form vorliegen können.

Demnach erfüllt der Gegenstand des vorliegenden Anspruchs 1 nicht die Erfordernisse der Artikel 33(2)(3) PCT.

Das gleiche gilt für Anspruch 2, dessen Neuheit durch die Lehre von (2) vorweggenommen wird.

Erfinderische Tätigkeit:

Keines der vorliegenden Dokumente beschäftigt sich mit der Aufgabe, welcher der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegt, nämlich der Bereitstellung von aus hPTH abgeleiteten Peptidfragmenten, welche die Herstellung von Antikörpern ermöglichen, mit deren Hilfe aktive hPTH

Peptidfragmente von nicht-aktiven hPTH Peptidfragmenten unterschieden werden können. Im Hinblick auf den zur Verfügung stehenden Stand der Technik scheint demnach der Gegenstand der Ansprüche 3-5 auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen (Art. 33(3) PCT).

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

Falls die vorliegende internationale Anmeldung als Euro-PCT Anmeldung weiter verfolgt wird, wird die Anmelderin darauf aufmerksam gemacht, dass der Gegenstand der Ansprüche 3 und 4, welche sogenannte Product-by-process claims sind, weder als neu noch als erfinderisch betrachtet werden würde, denn die in diesen Ansprüchen definierten Antikörper sind z.B. von dem in (3) offenbarten monoklonalen Antikörper A1-64 oder von den in Chemical Abstracts, vol. 96, no. 5, 01.02.82, Abstractnr. 29060, S.R. Nussbaumer et al. (6) beschriebenen nicht zu unterscheiden.

Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ~~ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente~~ erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven⁷ h-PTH.

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für^{das} N-terminales⁷ Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10^{-12} mol/l^{el} gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmuno-metric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sor-bent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormone by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem ~~h~~-PTH beseitigt werden können.

Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch ^{die nachfolgenden} Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37):
~~(enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:)~~

hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-OH (30)

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-OH (31)

hPTH 24-32

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

~~hPTH 24-30~~

~~NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)~~

GEÄNDERTES BLATT

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH

⁴
(3~~8~~)

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH

⁵
(3~~8~~)

Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für hPTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerläßlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem soweit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

GEÄNDERTES BLATT

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunoglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fractionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_c auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcar-

GEÄNDERTES BLATT

Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wäßriger Lösung lyophilisiert.

Beispiel 2

Reinigung und Analyse

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

Die Reinheit der Produkte ^{wird} ~~werden~~ durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

Beispiel 3

Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder-serumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

GEÄNDERTES BLATT

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☐ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☒ der Beschreibung, Seite/n 3, 4, 8, 10 _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n 1, 2, 5, 6, 7, 9 _____, eingereicht mit Schreiben vom 14.10.96.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☒ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.
Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Nr. 1-4 (umnummeriert 1-5) _____, eingereicht mit Schreiben vom 14.10.96.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Zeichnungen, Blatt/Abb. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.
☐ Ansprüche: Nr. _____.
☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

Patentansprüche

5 | ~~1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -he-~~
liale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht struktu-
rierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei
~~injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.~~ /

10 1/2. Peptide ~~nach Anspruch 1~~ aus hPTH (1-37) mit der Sequenz

hPTH 1-10

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-OH}$ (1)

15 hPTH 1-9

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-OH}$ (2)

hPTH 1-8

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-OH}$ (3)

20

hPTH 1-7

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$ (4)

hPTH 1-6

25 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$ (5)

hPTH 1-5

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$ (6)

30 hPTH 9-18

$\text{NH}_2\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-Leu}^{11}\text{-Gly}^{12}\text{-Lys}^{13}\text{-His}^{14}\text{-Leu}^{15}\text{-Asn}^{16}\text{-Ser}^{17}\text{-Met}^{18}\text{-OH}$ (7)

35

GEÄNDERTES BLATT

- hPTH 10-18
NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)
- 5 hPTH 11-18
NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)
- hPTH 12-18
NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)
- 10 hPTH 13-18
NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)
- hPTH 14-18
NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)
- 15 hPTH 9-17
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)
- hPTH 9-16
20 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)
- hPTH 9-15
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)
- 25 hPTH 9-14
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)
- hPTH 9-13
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)
- 30 hPTH 24-37
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

35

GEÄNDERTES BLATT

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

5 hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

10 NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (21)

hPTH 28-37

15 NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-
OH (22)

hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

20 hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

25 NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

30 NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

35 NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

5

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-OH (30)

10

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
OH (31)

hPTH 24-32

15

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

20

~~hPTH 24-30
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)~~

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH (35)

25

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH (36)

2) 30

3. Peptide nach Anspruch 1 ~~und/oder 2~~ die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mause-
serumalbumin.

35